NGF E_{max}®免疫测试系统

原英文技术手册号码：**TB226**

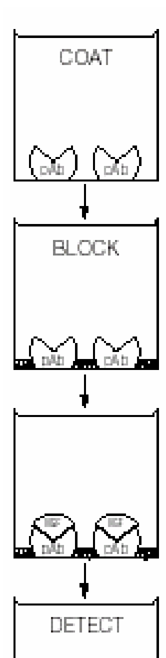


本手册是产品 **G7630** 和 **G7631** 的使用说明。*请废除以往版本。*
所有技术文件均可在www.promega.com上浏览到。
请访问该网站以确定您所使用的是该技术公告的最新版本。

I. 描述

NGF(神经生长因子) E_{max}® 免疫测试系统采用抗体夹心法（1）（图 1），灵敏、特异地测定 NGF 的含量。在这种方法中，平底 96 孔板包被上抗-NGF 的多克隆抗体（pAb），这些多克隆抗体可结合溶液中的 NGF，被捕获的 NGF 再与特异的单克隆抗体（mAb）结合。经过清洗，用偶联上辣根过氧化酶（HRP）的种属特异抗体作为第三级反应物， 来测定特异结合的单克隆抗体的量。将未结合的偶联物经过清洗去掉后，再与生色底物一同温育，检测颜色的改变。待测溶液中 NGF 的含量与氧化还原反应中产生的颜色成比例。采用这个测试系统，对组织培养上清液或组织提取物中 NGF 的定量范围是 7.8-500 pg/ml。





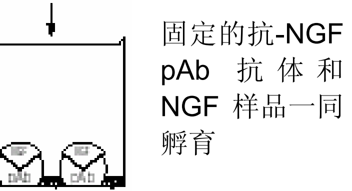
用抗 NGF pAb 抗体包被培养孔

配制包被抗体（每个 96 孔板）：2µl 抗 NGF pAb 抗体+12.5 ml 碳酸包被液（pH 9.7），混合，每孔加 100µl。盖上盖子，4℃孵育过液。清洗一次。



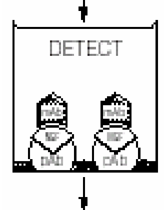
用 1×封闭和样品液封闭非特异结合

配制 1×封闭和样品液（每个 96 孔板）：34.4ml 去离子水+8.6ml 5×封闭和样品液。每个孔加入 200µl。不振荡，在室温孵育 1 小时。清洗 1 次。



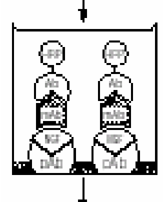
固定的抗-NGF pAb 抗体和 NGF 样品一同孵育

制备标准曲线。用 NGF 1×封闭和样品液按 1：2，000 比例稀释 NGF 标准品。向 A 行的第 11、12 列 2 个孔加入 200µl。作 6 次 1：2 的倍比稀释。将待测样品做类似稀释，每孔应含 100µl 样品。在室温振荡孵育 6 小时。清洗 5 次。



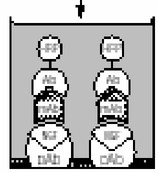
与抗 NGF mAb 一同孵育

配制二抗溶液（每个 96 孔板）：2.5µl 抗-NGF mAb+10 ml 的 1×封闭和样品液。每孔加 100µl。不振荡，4℃孵育过液。清洗 5 次。



与 HRP 标记的抗大鼠 IgG 抗体一同孵育

配制 HRP 标记的抗大鼠 IgG 抗体溶液（每个 96 孔板）：取 100µl HRP 标记的抗大鼠 IgG 抗体与 9.9 ml 的 1×封闭和样品液混合。每孔加 100µl。在室温振荡孵育 2.5 小时。清洗 5 次。**孵育过程中，将 TMB 溶液从冰箱中取出，使其温度恢复到室温。**



加入 TMB 单溶液，然后加入终止液，在酶标仪上比色。

每个板：每孔加入 100µl 平衡到室温的 TMB 单溶液，室温振荡孵育 10 分钟。

每孔加入 100µl 的 1N HCl 终止反应。**在 30 分钟内测定 A_{450}。**

图 1. NGF E^{max}® 免疫测试系统的操作步骤图示
若需详细操作手册或第一次使用这一系统，请仔细阅读章节III到VI。

NGF E_{max}® 免疫测试系统有如下的优势：

- 特异性：特异检测 NGF， 与浓度在 10ng/ml 的其它神经营养因子的交叉反应一般小于 3%。
- 灵敏度：可检测的 NGF 的最小量是 15.6pg/ml。
- 灵活：提供可供测试 2 个或 5 个 96 孔 ELISA 平板的包装，可按需要改变配置。
- 高值：提供优化的试剂和实验方案。



II. 产品组成

NGF E_{max}® 免疫测试系统提供两种规格，可供测试 2 个或 5 个 96 孔板。两种包装含有的试剂相同，只是产品 G7631 中的各种组份含量较多。

产品	规格	目录号
NGF E_{max}® 免疫测试系统	2×96 孔板	G7630

每个系统含有的试剂可测定 160 个样品（不包括平板）以及标准曲线，包括：

5µl	Anti-NGFpAb (抗 NGFpAb)
22ml	Block and Sample 5×Buffer（5×封闭和样品液）
20µl	NGF Standard（NGF 标准）
10µg	Anti-NGF mAb（抗 NGF mAb）
200µl	Anti-Rat IgG, HRP Conjugate（HRP 标记的抗大鼠 IgG）
25ml	TMB One Solution（TMB 单溶液）
1	Protocol

产品	规格	目录号
NGF E_{max}® 免疫测试系统	5×96 孔板	G7631

每个系统含有的试剂可测定 400 个样品（不包括平板）以及标准曲线，包括：

10µl	Anti-NGFpAb (抗 NGFpAb)
54ml	Block and Sample 5×Buffer（5×封闭和样品液）
50µl	NGF Standard（NGF 标准）
20µg	Anti-NGF mAb（抗 NGF mAb）
500µl	Anti-Rat IgG, HRP Conjugate（HRP 标记的抗大鼠 IgG）
2×25ml	TMB One Solution（TMB 单溶液）
1	Protocol

贮存条件：将整个系统的原包装避光保存在-20℃，从购买之日起 6 个月内产品稳定。一旦解冻，需保存在 4℃，系统在 3 个月内稳定。每个组分使用后应立即放到 4℃。不要重新冻存试剂。稀释后的试剂应当天使用。不要向稀释后的溶液内添加任何一种防腐剂，防腐剂可能干扰测试。

III. 注意事项

我们用以下的实验方案对 NGF E_{max}® 免疫测试系统作了测定。平板需包被过夜。次日，平板需封闭 1 小时，样品孵育 6 小时。与抗 NGF mAb 的反应也需过夜。当将 NGF 标准品和待测样品转移到平板上时，注意不要破坏或刮磨孔的表面，否则会导致 pAb 抗体的脱落，使信号明显减弱。如果不熟悉这项技术，在一个训练培养板上练习加样步骤。

测试方法的局限

- 只适用于研究，不能用于诊断。
- 吸收值超过标准曲线的范围为无效。
- 为获得稳定结果，需用 1×封闭和样品液稀释样品。



避免使用含有大量 IgG 的样品，如血清、血浆和脾脏。

不要用酸处理 NGF 标准品

HCl 和 NaOH 具有腐蚀性，切勿接触皮肤和眼睛。

IV. 样品制备

NGF E_{max}® 免疫测试系统可用来定量组织培养上清液或组织提取物中的 NGF。该系统使用了标记的抗大鼠 IgG 抗体，可以与样品中的小鼠 IgG 或人 IgG 发生交叉反应，使得吸收值读数升高。避免使用含有大量 IgG 的样品，如血清、血浆和脾脏。使用前将实验样品冰冻保存，不要反复冻融。在进行测试前，离心除去样品中的颗粒。

用几种种属的不同组织提取物进行实验，结果表明，酸化处理后再用碱中和，会增加可检测到的 NGF 的含量（2—4）。酸化处理会使 NGF 从 7S 态水解为 2.5S 态，或者导致可溶性受体释放 NGF，也可能两种情况都有。总之，可在体外对样品进行酸化处理， 这能增加可检测到的 NGF 的含量。酸化处理后 NGF 检测量的提高与种属和组织特异性有关，然而在某些情况下，酸处理可能会导致 NGF 检测量的下降。**因此，对每一特定的种属和组织而言，进行酸处理步骤的测定以确定预处理的效果是很重要的。**

注意：这一测试方法是用来测定游离的 NGF。如要测定样品中游离的成熟 NGF 蛋白，不要进行酸处理，直接按章节 V.A 的 ELISA 手册作实验。若要检测总的 NGF，先按下面的步骤进行酸处理及中和，然后再按 ELISA 步骤进行 NGF 测定。**不要将 NGF 标准品进行酸处理。**

酸处理步骤

实验中将样品按 1：5 比例用 Dulbecco 氏 PBS（DPBS）稀释酸化到大约 pH2.6，然后中和到大约 pH7.6。依据样品中载体蛋白的量，也许还需要或不再需要用 1×封闭和样品液作进一步的稀释，以减少 NGF 的损失。

对于蛋白含量低的样品，建议直接酸处理到 pH2.0-3.0，15-20 分钟。随后用 NaOH 中和，如需进一步的稀释，应使用 1×封闭和样品液，再将样品加到测试平板上。

对于所有实验样品，用 pH 试纸确认 pH 低于 3.0。如用动物血清，依据不同的种属，需要不同量的 1N HCl 来降低 pH。建议每 ml **未稀释**的血清或血浆加入 110-125μl 的 1N 的 HCl，在加入更多的酸以前，应先检测 pH 值。样品可提前作酸化处理并保存在-20℃或-70℃。

客户需准备的材料

（溶液组成见章节Ⅷ.B.）

- DPBS
- 1N HCl，试剂级
- 1N NaOH，试剂级

1. 加入 4 倍体积的 DPBS 对样品进行稀释。
2. 每 50μl 稀释的样品中加入 1μl 的 1N HCl，确认 pH 为 3.0 或低于 3.0。
3. 混合，在室温孵育 15 分钟。
4. 在每 50μl 稀释样品加入 1μl 的 1N NaOH 进行中和，检测 pH，使其约为 7.6。

V. NGF 定量步骤

客户需准备的材料
（溶液组成见章节Ⅷ. B.）

- 96 孔（平底）ELISA 板
- 碳酸包被液
- 平板密封膜
- TBST 清洗液
- 1N HCl
- 可在 450nm 测定吸收值的微孔板酶标仪
- 加样器，可准确加样的范围在 1μl-1ml
- 多道加样器
- 洗液瓶或自动平板清洗器
- 平板振荡仪
- 稀释用 50ml 或 15ml 聚丙稀管

A. 平板包被

1. 在 50ml 或 15ml 聚丙稀管中，向 12.5 ml 碳酸包被液中准确加入 2μl 抗 NGF pAb 抗体，配制成足够整个 96 孔板使用的包被液。**充分混合**，避免产生气泡。用多道加样器向聚苯乙稀 ELISA 板中加入包被液，每孔 100μl。

2. 用密封膜密封 ELISA 板，4℃孵育过夜。

注意：该测试使用的是按照章节 VIII.B 配制的碳酸包被液，已优化，其他缓冲液的效果可能不佳。

B. 配制 1×封闭和样品液

次日，每个 96 孔板需要大约 43 ml 的 1×封闭和样品液。配制 1×封闭和样品液时，在 50 ml 聚丙稀管中加入 34.4ml 去离子水，用消毒的加样头吸取 8.6ml 的 5×封闭和样品液，加入水中，注意不要污染贮液。使用前，将该溶液轻柔而充分地颠倒混合。

C. 封闭平板

1. 从冰箱中取出已包被的平板，轻轻甩去培养孔中的液体，倒置在纸巾上拍打三次，以去除残留的液体。使用自动平板清洗器，洗液瓶或多道加样器，用 TBST 清洗液充分清洗培养孔。如是手工清洗，在每个孔中加满 TBST 清洗液，然后向水槽中轻轻甩去培养孔中的液体，倒置在纸巾上拍打三次。用多道加样器在每个孔中加入 200μl 的 1×封闭和样品液。抗体结合到平板上后，不要接触或刮磨培养孔的表面。

2. **不要振荡**，在室温孵育 1 小时。



注意：此分析试剂已经过上列制造商 Nunc MaxiSorp™(产品目录号：439454) 和 DYNEX Immulon®-4(产品目录号：011-010-3855) 的酶标板的测试而没有显著性差异。为了得到各孔间最好的精确度，我们推荐使用高质量的、著名品牌的聚苯乙烯酶标板。

提示：未稀释的 Anti-NGF PAb 从 4℃取出后，应置于冰上保存

注意：我们强力推荐使用自动洗板机以保持结果的一致。



不要在任何两个步骤间让培养孔完全干燥。

提示：未稀释的 NGF 标准品从 4℃取出后，应置于冰上保存。

注意：系列稀释的样品有可能不呈线性。应使用接近标准曲线中段的吸收值所对应的样品稀释度进行检测。

注意：尽快加样以减少蒸发。

37℃孵育时不要叠放酶标板。

D．制备 NGF 标准曲线

系统提供的 NGF 标准品产生的线性标准范围在 7.8-500pg/ml。只可使用落在该线性范围内的值来推算待测样品中的 NGF 浓度。提供的 NGF 标准品的浓度是 1µg/ml，用 1×封闭和样品液按比 1：2000 的比例，准确稀释 NGF 标准品，使其浓度达到 500pg/ml。例如，将 10µl NGF 标准品加入到 390µl 1×封闭和样品液（1：40 稀释），然后将 10µl 的上述稀释液加入到 490µl 的 1×封闭和样品液中，进行 1：2000 稀释。

1．封闭平板完成后，向水槽中轻轻甩去培养孔中的液体。倒置在纸巾上拍打三次以除去残留液体，按章节 V.C 步骤 1 所述，用 TBST 清洗液清洗一次。用 2 列孔（16 个孔）来制备标准曲线。在测试平板中，配制 NGF 标准品时，在用来制备标准曲线的 2 列孔的行 B 到行 H 孔中加入 100µl/孔 1×封闭和样品液（图 2）。

2．在用来制备标准曲线的每列培养孔的第 1 个孔中，加入稀释的 200µl NGF 标准品（500pg/ml）。

3．在用来制备标准曲线的两列孔的后续孔中，接着按 1：2 的比例将 NGF 标准品作系列稀释（100µl/孔）。在制备标准曲线的两列孔的最后一对孔中，不要加入 NGF。平板中的 NGF 标准品的终浓度（2 个复孔）在 0-500 pg/ml 范围内（图 2）。

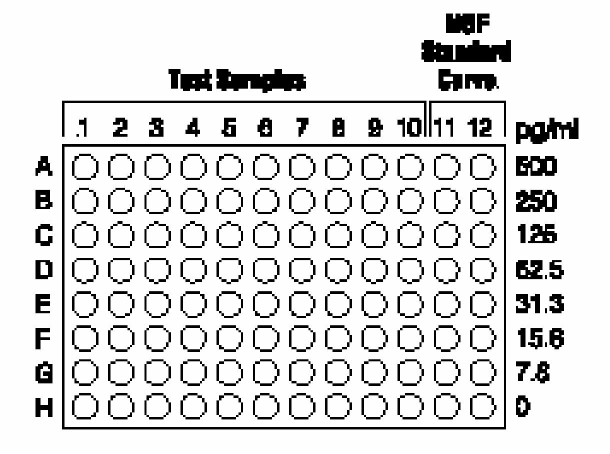


图 2.　进行标准曲线和测试样品的 ELISA 平板示意图

E．加样

建议首先将样品按 1：4 的比例稀释，接着在 ELISA 平板中的每一列按 1：2 作倍比稀释。也可以先对单一浓度的样品进行筛选，然后对不在线性范围内的阳性样品作重新测试，来确定 NGF 的准确浓度。

样品的载体溶液也会提供一些非特异的 NGF 来源（如培养基中的血清），建议测试单独含有载体溶液的一系列阴性对照反应。

1．在制备了 NGF 标准曲线后，在其它培养孔中加入 100µl 样品（依据具体实验要求已作或未作酸处理）（样品的酸处理见章节 IV）。**注意：**尽快加样以减少蒸发。

2．用密封膜密封培养孔，在室温振荡孵育 6 小时（500±100rpm）。

注意：使用振荡器可获得最好的结果。也可将 96 孔板置于 37℃孵育，不振荡，但可能使测试敏感性略微降低。

3. 按章节 V.C 步骤 1 用 TBST 清洗液将所有培养孔清洗 5 次。

F. 加入抗 NGF mAb

1. 在 50ml 或 15ml 聚丙稀管中，向 10 ml 的 1×封闭和样品液中加入 2.5μl 的抗 NGF mAb（1：4，000 的比例稀释），可配制成足够用于整个 96 孔板的溶液。**充分混合**，但不要产生气泡。用多道加样器向每个孔中加入 100μl 稀释的抗 NGF mAb，注意不要接触或刮磨孔的底面和侧壁。

2. 用密封膜密封培养孔，**不要振荡**，4℃孵育过液。
3. 次日，按章节 V.C 步骤 1 用 TBST 清洗液将所有培养孔清洗 5 遍。

G. 加入 HRP 标记的抗大鼠 IgG

1. 在 15 ml 聚丙稀管中，将 8ml 去离子水和 2ml 5×封闭和样品液混合，配制成 10ml 新鲜的 1×封闭和样品液。同样，不要污染贮液。使用前颠倒数次，温和而充分地混合。

2. 在 50ml 或 15ml 聚丙稀管中，向 9.9 ml 的 1×封闭和样品液中准确地加入 100μl HRP 标记的抗大鼠 IgG 贮液（1：100 的比例稀释），配制成足够用于 96 孔板的溶液。**充分混合**，避免产生气泡。用多道加样器向每个孔中加入 100μl 稀释的标记抗体，注意不要接触或刮磨孔的底面和侧壁。

3. 室温振荡（500±100rpm）、孵育 2.5 小时，。

   注意：若使用平板振荡器，最后得到的实验结果最佳。 也可以在孵育时不振荡，但灵敏度会有所下降。

4. 按章节 V.C 步骤 1 用 TBST 清洗液将所有培养孔清洗 5 遍。

H. 生色反应

1. 用多道加样器向每个孔中加入 100μl 恢复至室温的 TMB 单溶液。

2. 在室温振荡、孵育 10 分钟。

3. 按照步骤 1 加入 TMB 单溶液的同样顺序，加入 100μl 的 1N HCl 来终止反应。酸化后，蓝色变为黄色，注意不要产生气泡。

4. 在终止反应后 30 分钟内，在平板酶标仪的 450nm 处记录吸收值。



提示：抗-NGF mAb 和 HRP 标记的抗大鼠 IgG，从 4℃取出后，应将其置于冰上保存。

提示：在孵育期间，将 TMB 单溶液恢复至室温。

警告：小心避免让 TMB 单溶液及 IN HCl 接触皮肤或眼睛。

注意：若要得到准确的测量结果，酶标板的外底必须干净。如果需要可用 70% 乙醇擦拭酶标板的外底。



I.　　标准曲线

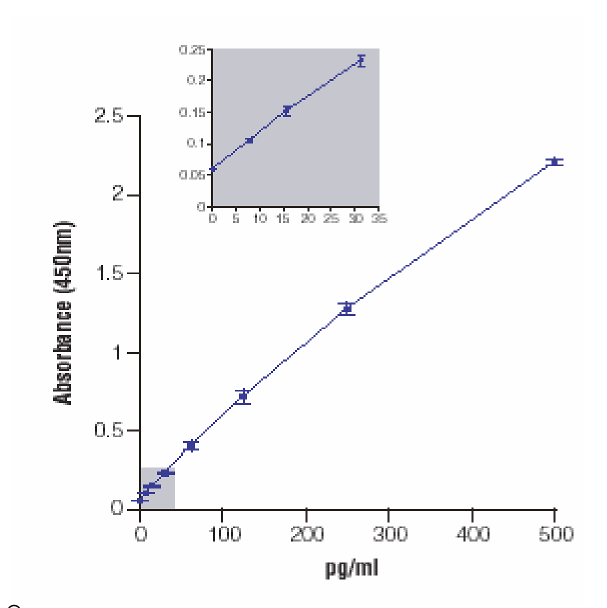


图 **3.**　使用 **NGF E$_{max}$®** 免疫测试系统制备的 **NGF** 标准曲线
插入图是放大的 0-31.252pg/ml 曲线段

VI. 疑难解答

问题	可能的原因	建议
样品的吸收值高于标准曲线的范围	样品太浓	进一步稀释样品
		测试每个样品的多种稀释度，以保证至少有一个样品稀释度处于标准曲线的有效范围内。
样品的吸收值低于标准曲线的范围	样品太稀	用浓度更高的样品进行测试
所有样品的吸收值均高	在溶液和培养基中含有 NGF	在溶液和培养基中可能含有 NGF。设置只加载体溶液，不加样品的阴性对照实验。
	显色反应时间太长	吸收值超过了平板读数仪的动态范围，减少显色反应的时间，或使用动态范围更宽的平板酶标仪。
	使用的是含有大量 IgG 的小鼠、人及大鼠的样品	避免使用含有大量 IgG 的样品，如血清、血浆和脾脏。
所有样品的吸收值均低	显色反应太慢	增加显色反应的时间
		重新检查每一反应组分的稀释度
平行样品之间存在差异	进行测试时存在技术问题	保证所有的培养孔都被充分清洗。
		使平板在室温中升温 10-15 分钟，再开始封闭步骤。
		按照加入 TMB 单溶液的加样顺序加入终止液
		在加每种试剂前，更换加样头。
		增加平行样的个数
		校准加样器
NGF 标准活力低	贮存不当	如果不稀释，标准在-20℃可稳定保存 6 个月，在 4℃可稳定保存 3 个月。



如遇到这里未提及的疑难问题，请与美国普洛麦格公司北京办事处联系，或查询我们的网站 www.promega.com.

E-mail: techserv@promega.com



VII. 参考文献

1. Hornbeck, P. (1994) In: *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, Coico, R ed., John Wiley & Sons, Inc, Unit2.1.
2. Zettler, C. et al. (1996) Detection of increased tissue concentrations of nerve growth factor with an improved extraction procedure. *J. Neurosci. Res* 46, 581-594.
3. *Acid Treatment of NGF Samples* (1996) *Neural Notes* II (3), 23.
4. Okragly, A. J. and Haak-Frendscho, M. (1997) An acid-treatment method for the enhanced detection of GDNF in biological samples, *Exp. Neurol*. 145, 592-596.

VIII 附录

A. NGF E_{max}® 免疫测试系统的质量特点

NGF E_{max}® 免疫测试系统的交叉反应

NGF E_{max}® 免疫测试系统与结构相似的生长因子，如重组脑源性神经营养因子（rhBDNF），神经营养因子-3(rhNT-3)，神经营养因子-4(rhNT-4)，在浓度高达 10ng/ml 时有很低的交叉反应，如下表所示。

神经营养因子	实际浓度（ng/ml）	%交叉反应
BDNF	10	0.078
NT-3	10	0.078
NT-4	10	0.078

为了评估该测试系统的特异性， 用 10ng/ml 的 rhBDNF（目录号 G1491）， NT-3（目录号 G1501）和 rhNT-4（目录号 G1511）按章节 III-V 所描述的步骤，测试其结合力。结果表示的是 3 次重复测试的平均值。

不同批次测试之间的比较

将经过酸处理的待测样品用 1×封闭和样品液稀释， 由同一个操作者将每种样品重复测定 8 次。

	NGF	
	样品1	样品2
样品数	8	8
平均值（pg/ml）	194	402
标准差（pg/ml）	8	17
变异系数	4.1	4.2

B. 缓冲液和溶液的组分



1N HCl

将 82.7ml 的浓 HCl 加入到 917.3ml 的去离子水中。

碳酸盐包被缓冲液

0.025M 碳酸氢钠
0.025M 碳酸钠
用 1N HCl 或 1N NaOH 调节 pH 到 9.7

裂解液

137mM	NaCl
20mM	Tris HCl (pH8.0)
1%	NP40
10%	甘油
1mM	PMSF
10μg/ml	aprotinin（抑酶肽）
1μg/ml	leupeptin（亮抑酶肽）
0.5mM	钒酸钠

DPBS（每升）

0.2g	KCl
8.0g	NaCl
0.2g	KH_2PO_4
1.15g	Na_2HPO_4
133mg	$CaCl_2.2H_2O$
100mg	$MgCl_2.6H_2O$

将温度是室温的去离子水加入到 KCl，NaCl，KH_2PO_4 和, Na_2HPO_4 至终体积为 1 升，如有必要，用 1N HCl 或 1N NaOH 调节 pH 到 7.35，然后加入 $MgCl_2.6H_2O$，充分混合， 然后加入 $CaCl_2.2H_2O$ 充分混合。

TBST 清洗液

20mM	Tris-HCl (pH7.6)
150mM	NaCl
0.05%(v/v)	Tween® 20